

# Induksi Kalus serta Regenerasi Tunas dan Akar Cabai melalui Kultur *In Vitro*

Ifa Manzila<sup>1\*</sup>, Sri H. Hidayat<sup>2</sup>, Ika Mariska<sup>1</sup>, dan Sriani Sujiprihati<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111  
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; \*E-mail: ifa-biogen@yahoo.com

<sup>2</sup>Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680

<sup>3</sup>Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680

Diajukan: 22 Januari 2010; Diterima: 19 Juli 2010

## ABSTRACT

**Callus Induction and Regeneration of Shoot and Root of Chill through *In Vitro* Culture. Ifa Manzila, Sri H. Hidayat, Ika Mariska, and Sriani Sujiprihati.** *In vitro* culture is one way for a fast and effective plant propagation. This method is also useful for preliminary selection of plant resistance to disease, including the chili. *In vitro* propagation method for chili has not been widely reported. A study was conducted to obtain effective techniques for callus induction and regeneration into shoots on three red chili cultivars (cv) Gelora, Sudra, and Chili 109. The study consisted of four activities, namely the induction of callus formation, induction of embryogenic callus, callus regeneration into adventitious shoots, and root induction from the adventitious shoots. Murashige Skoog (MS) medium + 0.6% agar + 3% sucrose were used as basal medium, 20 ml/bottle. Young leaves, hypocotyls and root tips of 21-day-old chili seedlings were used as sources of explants. Each experiment was arranged in a completely randomized design with 10 replications, one culture bottle for each treatment. The callus induction experiments using the explants of young leaf explants, hypocotyl, and root tips were done separately. Each treatment consisted of explants from the three chili cultivars on MS medium containing three composition of growth regulators (PGR) BAP + NAA, 10 explants/bottle. The embryogenic callus induction was conducted by growing the callus in bottles containing a medium that contains three compositions PGR 2,4-D + thidiazuron 0.5 mg/l. Induction of shoot formation was done by growing the embryogenic callus on medium containing three composition of plant growth regulator BAP + NAA. Induction of root formation was performed by growing adventitious shoots on ½ MS and 1 MS medium + NAA 0.5 to 1.0 mg/l. The results showed that young leaves are the best explant source for callus and shoot formations in chili through tissue culture compared with the hypocotyl and the tip. Gelora is the most responsive chili cultivar to callus, shoots, and roots formation of in their respective medium, compared to Sudra and Chile 109. MS medium containing BAP 3-7 mg/ml and NAA 1 mg/ml can be used to induce the growth of callus from young leaf explants, hypocotyl and seedling root tip chili cv Gelora, Sudra, and Chile 109, but its growth was very slow and did not produce embryogenic callus. Embryogenic callus formation can be induced by both non-embryogenic callus

growing the callus on MS medium containing 2,4-D 3 mg/l + thidiazuron 0.5 mg/l. Formation of callus that can regenerate into shoots should use an MS medium containing 2,4-D 3 mg/l + thidiazuron 0.5 mg/l followed by subculture on MS medium + BAP 3 mg/l + thidiazuron 0.5 mg/l to induce shoot elongation. Medium ½ MS and 1 MS containing NAA 0.5-1.0 mg/l can be used to induce root formations on shoot culture of chili cv Gelora but not for cv Chili 109.

**Keywords:** Callus induction, regeneration, chili, *in vitro* culture.

## ABSTRAK

**Induksi Kalus serta Regenerasi Tunas dan Akar Cabai Melalui Kultur *In Vitro*. Ifa Manzila, Sri H. Hidayat, Ika Mariska, dan Sriani Sujiprihati.** Kultur *in vitro* merupakan salah satu cara perbanyakan tanaman yang cepat dan efektif. Metode ini juga bermanfaat untuk seleksi awal ketahanan tanaman terhadap penyakit. Metode perbanyakan *in vitro* tanaman cabai belum banyak diteliti. Penelitian dilakukan untuk memperoleh teknik yang efektif untuk induksi kalus dan regenerasinya menjadi tunas pada tiga kultivar (cv) cabai merah Gelora, Sudra, dan Chili 109. Penelitian terdiri atas empat kegiatan, yaitu (1) induksi pembentukan kalus, (2) induksi pembentukan kalus embriogenik, (3) regenerasi kalus menjadi tunas adventif, dan (4) induksi pembentukan akar dari tunas adventif. Masing-masing kegiatan dilakukan dalam botol kultur dengan menggunakan media dasar Murashige Skoog + agar 0,6% + sukrose 3% (MS), 20 ml/botol. Sumber eksplan yang digunakan adalah daun muda, hipokotil, dan ujung akar kecambah cabai berumur 21 hari. Masing-masing percobaan menggunakan rancangan acak lengkap dengan 10 ulangan. Tiap botol kultur merupakan satu perlakuan. Pada percobaan induksi kalus dari eksplan potongan daun muda, hipokotil, dan ujung akar dilakukan secara terpisah. Masing-masing perlakuan terdiri penanaman eksplan dari ketiga kultivar cabai pada media MS yang mengandung tiga komposisi zat pengatur tumbuh (ZPT) BAP + NAA berbeda, 10 eksplan/botol. Induksi kalus embriogenik dilakukan dengan menumbuhkan kalus dalam botol berisi media yang mengandung tiga komposisi ZPT 2,4-D + thidiazuron. Induksi pembentukan tunas dilakukan dengan menumbuhkan kalus embriogenik pada media yang mengandung tiga komposisi ZPT BAP + NAA. Induksi pembentukan akar dilakukan dengan menumbuhkan tunas adventif

pada media MS  $\frac{1}{2}$  dan MS 1 + NAA 0,5-1,0 mg/l. Hasil penelitian menunjukkan bahwa daun muda adalah sumber eksplan terbaik untuk pembentukan kalus dan tunas cabai. Kultivar Gelora paling responsif terhadap pembentukan kalus, tunas, dan akar pada media yang digunakan dibandingkan dengan Sudra dan Chili 109. Media MS + BAP 3-7 mg/ml + 1 mg/ml dapat digunakan untuk menginduksi pertumbuhan kalus eksplan daun muda, hipokotil, dan ujung akar cv Gelora, Sudra, dan Chili 109, tetapi pertumbuhannya sangat lambat dan tidak menghasilkan kalus embriogenik. Pembentukan kalus embriogenik dapat diinduksi dengan menumbuhkan kalus non embriogenik pada media MS + 2,4-D 3 mg/l + thidiazuron 0,5 mg/l. Pembentukan kalus menjadi tunas (kalus yang dapat beregenerasi) sebaiknya menggunakan media MS + 2,4-D 3 mg/l + thidiazuron 0,5 mg/l, dilanjutkan dengan subkultur pada media MS + BAP 3 mg/l + thidiazuron 0,5 mg/l untuk pemanjangan tunas. Media MS  $\frac{1}{2}$  atau MS 1 + NAA 0,5-1,0 mg/l dapat digunakan untuk induksi pembentukan akar pada kultur tunas cabai cv Gelora.

**Kata kunci:** Induksi kalus, regenerasi, cabai, kultur *in vitro*.

## PENDAHULUAN

Cabai merupakan tanaman asli daerah tropis yang berasal dari Amerika Selatan dan Amerika Tengah, kemudian menyebar ke seluruh dunia (Berke, 2002). Tanaman cabai termasuk famili Solanaceae yang memiliki banyak jenis dan varietas, tetapi yang umum dibudidayakan untuk konsumsi adalah cabai besar, cabai keriting, cabai rawit, dan paprika (Wiryanta, 2002). Cabai merah (*Capsicum annum* L.) merupakan komoditas andalan hortikultura di Indonesia. Menurut Direktorat Jenderal Bina Produksi Hortikultura (2004), cabai memiliki luas panen terbesar di antara tanaman sayuran lainnya, yaitu 150.598 ha pada tahun 2002 dan 176.264 ha pada tahun 2003. Tanaman ini memiliki nilai ekonomis yang cukup baik, ditanam di seluruh provinsi di Indonesia, dan mendapat prioritas untuk dikembangkan (Badan Pusat Statistik, 2009; Direktorat Bina Program Tanaman Pangan dan Hortikultura, 2004).

Produktivitas cabai di Indonesia masih sangat rendah apabila dibandingkan dengan potensi produksi tanaman yang dapat mencapai 10 t/ha (Suwandi *et al.*, 1989). Produktivitas nasional cabai pada tahun 2004 dan 2005 berturut-turut 5,67 t/ha dan 5,84 t/ha (Direktorat Jenderal Bina Produksi Hortikultura, 2007). Beberapa faktor penyebabnya adalah cara bercocok tanam yang belum tepat, pemupukan yang berimbang, dan sulit mendapatkan benih bermutu dan murah. Faktor lain yang menyebabkan rendahnya produksi cabai nasional adalah gangguan hama dan penyakit (Duriat *et al.*, 1996). Berbagai upaya telah dilakukan untuk mengendalikan penyakit-penyakit utama

tanaman cabai, di antaranya adalah pengembangan varietas tahan.

Dalam pemuliaan, jika sumber gen ketahanan terhadap suatu patogen sangat terbatas dan sulit dipindahkan ke tanaman lain melalui persilangan biasa, maka salah satu cara memindahkannya adalah menggunakan metode kultur *in vitro* untuk mendapatkan populasi varian somaklonal (Hutami *et al.*, 2006). Pemanfaatan fenomena variasi somaklon dalam pemuliaan tanaman pada umumnya dilakukan melalui kombinasi dengan induksi mutasi baik secara fisik maupun kimiawi. Salah satu faktor yang menentukan keberhasilan induksi mutasi adalah penguasaan metode regenerasi eksplan menjadi individu baru. Beberapa faktor utama yang berpengaruh terhadap keberhasilan sistem regenerasi tanaman pada kultur jaringan adalah komposisi media, jenis eksplan (batang, daun, biji), dan kultivar atau varietas tanaman (Moghaieb *et al.*, 1999; Gubis *et al.*, 2003; Kintzios *et al.*, 2000; Parimalan *et al.*, 2007).

Informasi tentang regenerasi *in vitro* tanaman cabai masih terbatas (Arous *et al.*, 2001; Kintzios *et al.*, 2000) kebanyakan mengenai metode regenerasi paprika (cabai manis). Oleh karena itu, studi untuk mendapatkan regenerasi tanaman cabai perlu dilakukan untuk memperoleh sistem regenerasi yang efisien dan stabil. Beberapa usaha yang dilakukan untuk memperoleh sistem regenerasi yang efisien pada cabai adalah dengan menentukan parameter yang spesifik pada tanaman. (Kintzios *et al.*, 2000; Parimalan *et al.*, 2007).

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk untuk memperoleh teknik induksi dan regenerasi kalus yang tepat untuk memperbanyak tanaman cabai melalui kultur jaringan.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Sel dan Jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor, dari bulan Agustus 2007 sampai dengan Desember 2008. Bahan tanaman yang digunakan adalah benih tiga kultivar (cv) cabai (Gelora, Sudra, dan Chili 109). Sebagai sumber eksplan digunakan kecambah dari benih cabai dikecambahkan secara *in vitro*. Sebelum dikecambahkan, benih dari masing-masing kultivar cabai direndam dalam akuades dan dikocok selama 12 jam untuk merangsang perkecambahan. Selanjutnya, benih disterilisasi dengan merendam secara berturut-turut dalam larutan alkohol 70% selama 5 menit, larutan HgCl<sub>2</sub> 0,2% selama 2 menit, serta larutan Na-hipoklorit 30% dan 20% masing-

masing 10-15 menit, kemudian dicuci dengan akuades steril. Setelah sterilisasi, benih masing-masing kultivar cabai dikecambahkan dalam botol kultur yang berisi media dasar MS (Murashige dan Skoog Agar, 1962) yang mengandung sukrosa 3% dan agar 0,6%, tanpa zat pengatur tumbuh, dan pH media sebelum sterilisasi 5,8. Kecambah dari ketiga kultivar cabai yang telah berumur 21 hari digunakan sebagai sumber eksplan. Penelitian terdiri atas empat kegiatan, yaitu (1) induksi pembentukan kalus, (2) induksi pembentukan kalus embriogenik, (3) induksi regenerasi tunas, dan (4) induksi pengakaran pada tunas.

### **Induksi Pembentukan Kalus**

Percobaan dilakukan pada media induksi kalus (MK), yaitu media dasar MS Murashige dan Skoog (MS, 1962) yang mengandung benzyl amino purine (BAP) dan  $\alpha$ -naphthalene acetic acid (NAA) sebagai zat pengatur tumbuh (ZPT). Komposisi MK yang diuji adalah (1) MS + BAP 3 mg/l + NAA 1 mg/l (MK-1); (2) MS + BAP 5,0 mg/l + NAA 1 mg/l (MK-2), dan (3) MS + BAP 7,0 mg/l + NAA 1 mg/l (MK-3). Sebagai bahan eksplan digunakan potongan daun muda, hipokotil, dan ujung akar dari kecambah tiga kultivar cabai yang telah disiapkan, dengan ukuran masing-masing 3-5 mm. Masing-masing jenis eksplan ditumbuhkan dalam botol kultur yang berisi MK 20 ml, 5-12 eksplan per botol. Percobaan untuk setiap jenis eksplan dilakukan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 10 ulangan, tiap perlakuan terdiri atas satu botol kultur. Perlakuan terdiri atas tiga jenis MK, yaitu MK-1; (2) MK-2, dan (3) MK-3. Semua kultur diinkubasi pada ruang kultur dengan suhu berkisar 25-27°C di bawah sinar lampu floresen dengan intensitas cahaya 800-1.000 lux, 16 jam/hari.

Pengamatan dilakukan setiap hari hingga empat bulan setelah inkubasi. Parameter yang diamati adalah jumlah dan persentase eksplan yang berkalus serta jumlah, ukuran, dan jenis kalus yang terbentuk pada masing-masing MK. Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dan perbedaan antar perlakuan diuji menggunakan uji beda nyata Duncan dengan taraf nyata 5%.

### **Pembentukan Kalus Embriogenik**

Pada percobaan induksi kalus dengan media MK yang mengandung BAP pertumbuhan kalus sangat lambat dan tidak menghasilkan kalus embriogenik, sehingga percobaan dilanjutkan dengan induksi kalus embriogenik menggunakan ZPT yang berbeda, yaitu 2,4-D dan thidiazuron (TDZ). Percobaan dilakukan menggunakan tiga komposisi media, yaitu (1) MKE-1 (MS + 2,4-D 1 mg/l + TDZ 0,1 mg/l); (2) MKE-2 (MS +

2,4-D 3 mg/l + TDZ 0,1 mg/l), dan (3) MKE-3 (MS + 2,4-D 5 mg/l + TDZ 0,1 mg/l). Kalus terpilih dari percobaan sebelumnya ditumbuhkan dalam botol kultur yang berisi MKE 20 ml, 10 eksplan per botol. Percobaan untuk setiap jenis eksplan dari cabai cv Gelora, Sudra, dan Chili 109. Percobaan menggunakan RAL dengan perlakuan tiga komposisi MKE dan tiga sumber tunas. Tiap perlakuan terdiri atas satu botol kultur. Semua kultur diinkubasi pada ruang kultur dengan suhu berkisar 25-27°C di bawah sinar lampu floresen dengan intensitas cahaya 800-1.000 lux, 16 jam/hari.

Pengamatan dilakukan setiap hari hingga 4 bulan setelah inkubasi. Parameter yang diamati adalah jumlah dan persentase eksplan yang membentuk kalus serta rata-rata jumlah kalus embriogenik dari setiap kalus. Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dan perbedaan antar perlakuan diuji menggunakan uji beda nyata Duncan dengan taraf nyata 5%.

### **Induksi Pembentukan Tunas dari Kalus Embriogenik**

Percobaan regenerasi tunas dari kalus embriogenik dilakukan dengan menggunakan kalus embriogenik yang diperoleh dari percobaan sebelumnya. Kalus ditumbuhkan pada media dasar MS yang ditambah tiga dosis BAP berbeda (1, 3, dan 5 mg/l) + TDZ (0,5 mg/l) sebagai ZPT. Percobaan menggunakan RAL dengan sembilan perlakuan kombinasi antara kalus embriogenik yang berasal dari kalus tiga kultivar cabai (Gelora, Sudra, dan Chili 109) dengan tiga komposisi media regenerasi, yaitu MR-1 (MS + BAP 1 mg/l + TDZ 0,5 mg/l), MR-2 (MS + BAP 1 mg/l + TDZ 0,5 mg/l), dan MR-3 (MS + BAP 1 mg/l + TDZ 0,5 mg/l). Setiap perlakuan induksi pembentukan tunas dilakukan dalam botol kultur yang berisi 20 ml media regenerasi. Setiap botol kultur yang berisi 10 kalus embriogenik merupakan satu perlakuan. Semua kultur diinkubasi pada ruang kultur dengan suhu berkisar 25-27°C di bawah penyorotan lampu floresen dengan intensitas cahaya 800-1.000 lux selama 16 jam dalam sehari.

Pengamatan dilakukan setiap hari hingga 4 bulan setelah inkubasi. Parameter yang diamati adalah rata-rata waktu inisiasi tunas (minggu), tinggi tunas (cm), jumlah tunas/kalus, dan jumlah daun/tunas persentase eksplan yang membentuk kalus serta ukuran dan jenis kalus. Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dan perbedaan antar perlakuan diuji menggunakan uji beda nyata Duncan dengan taraf nyata 5%.

### Induksi Pembentukan Akar dari Tunas Adventif

Induksi pembentukan akar hanya dilakukan pada tunas dari cv Gelora dan Chili 109, yang diperoleh dari kegiatan sebelumnya. Tunas dikulturkan pada dua komposisi media perakaran, yaitu MA-1 (MS  $\frac{1}{2}$  + NAA 0,5 mg/l dan (2) MS 1 + NAA 0,5 mg/l. Percobaan dilakukan menggunakan RAL dengan 10 ulangan. Tiap perlakuan terdiri atas satu botol kultur yang berisi 5-12 kalus. Semua kultur diinkubasi pada ruang kultur dengan suhu berkisar 25-27°C di bawah penyorotan lampu floresen dengan intensitas cahaya 800-1.000 lux selama 16 jam dalam sehari.

Pengamatan dilakukan setiap hari selama 4 bulan terhadap banyaknya tunas yang berakar dan penampilan kultur secara visual. Respon setiap eksplan dihubungkan dengan keefektifan regenerasinya secara *in vitro*. Analisis statistik dilakukan menggunakan uji jarak berganda Duncan dengan taraf nyata 5%.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Induksi Pembentukan Kalus

Pada penelitian induksi kalus, ketiga jenis eksplan (daun muda, hipokotil, dan ujung akar) dari ketiga kultivar cabai yang diuji (Gelora, Sudra, Chili 109) yang ditumbuhkan pada media induksi kalus yang mengandung tiga konsentrasi BAP (MI-1, MI-2, dan MI-3) mampu membentuk kalus dengan respon yang beragam, tetapi tidak diperoleh kalus embriogenik yang dapat diregenerasi lebih lanjut menjadi tunas (Tabel 1, Tabel 2, dan Tabel 3).

### Pembentukan kalus dari daun muda

Pada MK-1, persentase pembentukan kalus dari eksplan daun muda pada Gelora, Sudra, dan Chili berkisar antara 83,3-99,8%, dengan rata-rata 91,1% dan persentase tertinggi pada cv Sudra. Berdasarkan ukuran kalus yang dibentuk, skor ukuran kalus pada ketiga kultivar berkisar antara 2 dan 3 atau berkisar antara 0,3->0,5 cm, dengan skor tertinggi pada kalus dari cv Sudra.

Pada MK-2, persentase pembentukan kalus pada cv Gelora, Sudra, dan Chili berkisar antara 91,7-99,8%, dengan rata-rata 97,2% dan persentase tertinggi pada cv Sudra. Skor ukuran kalus pada ketiga kultivar berkisar antara 2 dan 3 dengan skor tertinggi pada kalus dari cv Sudra.

Pada MK-3, persentase pembentukan kalus pada cv Gelora, Sudra, dan Chili berkisar antara 87,5-99,5%, dengan rata-rata 92,5% dan persentase tertinggi pada cv Gelora. Skor ukuran kalus pada ketiga kultivar berkisar antara 1-3 dengan skor tertinggi pada kalus dari cv Gelora.

Berdasarkan persentase rata-rata eksplan daun muda yang berkalus dari ketiga kultivar cabai yang diuji pada ketiga komposisi media induksi kalus, maka media yang terbaik untuk induksi kalus adalah MK-2. Sedangkan berdasarkan skor kalus yang terbentuk, maka media yang terbaik adalah MK-1 dan MK-2 yang membentuk kalus berukuran rata-rata sekitar 0,5 cm (Tabel 1).

**Tabel 1.** Pembentukan kalus dari eksplan daun muda cabai cv Gelora, Sudra, dan Chili 109 pada media MS dengan tiga kandungan BAP yang berbeda.

Media induksi kalus	Kultivar cabai	Jumlah eksplan		Eksplan berkalus (%)	Skor ukuran kalus
		Diuji	Berkalus		
MK-1	Gelora	50	20,02 b	90,0	2
	Sudra	50	49,88 a	99,8	3
	Chili 109	60	49,84 c	83,3	2
Rata-rata			39,9	91,1	2,3
MK-2	Gelora	120	109,69 b	91,7	3
	Sudra	160	159,69 a	99,8	2
	Chili 109	130	129,08 a	99,3	2
Rata-rata			132,82	97,2	2,3
MK-3	Gelora	140	139,28 a	99,5	3
	Sudra	100	89,59 b	89,6	2
	Chili 109	80	69,96 c	87,5	1
Rata-rata			99,61	92,5	2,0

MK-1 = MS + BAP 3 mg/ml + NAA 1 mg/ml, MK-2 = MS + BAP 5 mg/ml + NAA 1 mg/ml, MK-3 = MS + BAP 7 mg/ml + NAA 1 mg/ml. MS = Murashige dan Skoog (1962), BAP = benzyl amino purine, NAA =  $\alpha$ -naphthalene acetic acid. Skor ukuran kalus 0 = tidak berkalus, 1 = <0,3 cm, 2 = 0,3-0,5 cm, 3 = >0,5 cm.

Angka-angka pada satu lajur yang diikuti oleh huruf sama tidak berbeda pada taraf 5% menurut uji jarak berganda Duncan.

### Pembentukan kalus dari hipokotil

Pada MK-1, persentase pembentukan kalus dari eksplan hipokotil pada Gelora, Sudra, dan Chili, berkisar antara 83,3-99,1%, dengan rata-rata 91,1% dan persentase tertinggi pada cv Sudra. Berdasarkan ukuran kalus yang dibentuk, skor ukuran kalus pada ketiga kultivar masing-masing 1 atau <0,3 cm. Pada MK-2, persentase pembentukan kalus pada cv Gelora, Sudra, dan Chili berkisar antara 91,7-99,6%, dengan rata-rata 97,2% dan persentase tertinggi pada cv Sudra. Skor ukuran kalus pada ketiga kultivar berkisar antara 2 dan 3 dengan skor tertinggi pada kalus dari cv Sudra. Pada MK-3, persentase pembentukan kalus pada cv Gelora, Sudra, dan Chili berkisar antara 87,5-99,1%, dengan rata-rata 92,5% dan persentase tertinggi pada cv Gelora. Skor ukuran kalus pada ketiga kultivar berkisar antara 1-3 dengan skor tertinggi pada kalus dari cv Gelora. Berdasarkan persentase rata-rata eksplan hipokotil yang berkalus dari ketiga kultivar cabai yang diuji pada ketiga komposisi media induksi kalus, maka media yang terbaik untuk induksi pembentukan kalus adalah MK-2, diikuti MK-3 dan MK-1. Sedangkan berdasarkan skor kalus yang terbentuk, maka media yang terbaik adalah MK-1 dan MK-2 diikuti MK-3 (Tabel 2).

### Pembentukan kalus dari ujung akar

Pada MK-1, persentase pembentukan kalus dari eksplan ujung akar pada Gelora, Sudra, dan Chili, berkisar antara 71,4-99,9%, dengan rata-rata 84,9% dan persentase tertinggi pada cv Sudra. Berdasarkan ukuran kalus yang dibentuk, skor ukuran kalus pada ketiga kultivar masing-masing 1 atau <0,3 cm.

Pada MK-2, persentase pembentukan kalus pada cv Gelora, Sudra, dan Chili berkisar antara 0-99,8%, dengan rata-rata 53,0% dan persentase tertinggi pada cv Sudra. Pada MK-2 eksplan akar dari cv Gelora tidak membentuk kalus. Skor ukuran kalus pada cv Sudra dan Chili 109 masing-masing 1.

Pada MK-3, persentase pembentukan kalus pada cv Gelora, Sudra, dan Chili berkisar antara 0-99,7% dengan rata-rata 66,4% dan persentase tertinggi pada cv Sudra. Pada MK-3 eksplan akar dari cv Chili 109 tidak membentuk kalus. Skor ukuran kalus pada cv Gelora dan Sudra masing-masing 1.

Berdasarkan persentase rata-rata eksplan ujung akar yang berkalus dari ketiga kultivar cabai pada ketiga komposisi media induksi kalus yang digunakan, maka media yang terbaik untuk induksi pembentukan kalus adalah MK-1, diikuti MK-3 dan MK-2. Sedangkan berdasarkan skor kalus yang terbentuk, maka media yang terbaik adalah MK-1 (Tabel 3).

Berdasarkan data yang disajikan pada Tabel 1, Tabel 2, dan Tabel 3, maka dapat diketahui bahwa ketiga komposisi media induksi kalus yang diuji dapat digunakan untuk menginduksi pembentukan kalus dari eksplan daun muda, hipokotil, dan ujung akar yang berasal dari kecambah cabai cv Gelora, Sudra, dan Chili 109. MK-1 dan MK-2 yang masing-masing mengandung BAP 3 mg/l dan 5 mg/l cukup baik untuk menginduksi kalus. Eksplan daun muda memiliki respon berkalus yang terbaik pada ketiga media induksi kalus. Pengaruh jenis eksplan terhadap daya regenerasi tunas tanaman cabai telah dilaporkan oleh Arous *et al.* (2001) serta Ebida dan Hu (1993).

**Tabel 2.** Pembentukan kalus dari eksplan hipokotil cabai cv Gelora, Sudra, dan Chili 109 pada media MS dengan tiga kandungan BAP yang berbeda.

Media induksi kalus	Kultivar cabai	Jumlah eksplan		Eksplan berkalus (%)	Skor ukuran kalus
		Diuji	Berkalus		
MK-1	Gelora	60	48,96 ab	90	1
	Sudra	70	69,39 a	99,1	1
	Chili 109	60	39,75 b	83,3	1
Rata-rata			52,70	91,1	1
MK-2	Gelora	120	89,61 ab	91,7	3
	Sudra	70	69,75 a	99,6	3
	Chili 109	50	49,61 a	99,2	3
Rata-rata			69,65	97,2	3
MK-3	Gelora	40	39,65 a	99,1	1
	Sudra	80	79,71 ab	90	2
	Chili 109	50	29,75 b	87,5	2
Rata-rata			49,70	92,5	1,7

MK-1 = MS + BAP 3 mg/ml + NAA 1 mg/ml, MK-2 = MS + BAP 5 mg/ml + NAA 1 mg/ml, MK-3 = MS + BAP 7 mg/ml + NAA 1 mg/ml. MS = Murashige dan Skoog (1962), BAP = benzyl amino purine, NAA =  $\alpha$ -naphthalene acetic acid. Skor ukuran kalus 0 = tidak berkalus, 1 = <0,3 cm, 2 = 0,3-0,5 cm, 3 = >0,5 cm.

Angka-angka pada satu lajur yang diikuti oleh huruf sama tidak berbeda pada taraf 5% menurut uji jarak berganda Duncan.

Pada media kultur dapat dilihat dua macam kalus, yaitu yang berwarna hijau dengan tekstur kompak dan yang berwarna putih kecoklatan dengan tekstur remah. Subkultur berulang dari kalus yang terbentuk memberikan respon pembentukan tunas yang sangat rendah. Oleh karena itu, pada tahap penelitian berikutnya dilakukan modifikasi media dengan menggunakan ZPT 2,4-D dan TDZ untuk memperoleh tunas embriogenik yang akan digunakan untuk regenerasi tunas dan akar.

### Induksi Pembentukan Kalus Embriogenik

Pada percobaan ini jumlah eksplan dari ketiga kultivar cabai yang diuji tidak sama, disesuaikan dengan ketersediaan masing-masing kalus. Respon kalus dari ketiga genotipe cabai dalam membentuk kalus embriogenik pada tiga komposisi media beragam (Tabel 4). Pada media MKE-1, persentase pembentukan kalus dari eksplan asal cv Gelora, Sudra, dan Chili berkisar antara 60,0-99,8%, dengan rata-rata 81,1% dan persentase tertinggi pada cv Sudra diikuti Chili 109. Berdasarkan rata-rata jumlah kalus embriogenik per kalus yang terbentuk, maka yang tertinggi

**Tabel 3.** Pembentukan kalus dari eksplan ujung akar cabai cv Gelora, Sudra, dan Chili 109 pada media MS dengan tiga kandungan BAP yang berbeda.

Media induksi kalus	Kultivar cabai	Jumlah eksplan		Eksplan berkalus (%)	Skor ukuran kalus
		Diuji	Berkalus		
MK-1	Gelora	120	99,63 a	83,3	1
	Sudra	50	49,94 a	99,9	1
	Chili 109	70	49,61 b	71,4	1
Rata-rata			66,39	84,9	1
MK-2	Gelora	30	0	0	0
	Sudra	70	69,83 a	99,8	1
	Chili 109	50	29,53 c	59,1	1
Rata-rata			33,12	53,0	0,7
MK-3	Gelora	60	59,75 a	99,6	1
	Sudra	80	79,78 a	99,7	1
	Chili 109	20	0	0	0
Rata-rata			46,51	66,4	0,7

MK-1 = MS + BAP 3 mg/ml + NAA 1 mg/ml, MK-2 = MS + BAP 5 mg/ml + NAA 1 mg/ml, MK-3 = MS + BAP 7 mg/ml + NAA 1 mg/ml. MS = Murashige dan Skoog (1962), BAP = benzyl amino purine, NAA =  $\alpha$ -naphthalene acetic acid. Skor ukuran kalus 0 = tidak berkalus, 1 = <0,3 cm, 2 = 0,3-0,5 cm, 3 = >0,5 cm.

Angka-angka pada satu lajur yang diikuti oleh huruf sama tidak berbeda pada taraf 5% menurut uji jarak berganda Duncan.

**Tabel 4.** Pembentukan kalus embriogenik dari kalus cabai cv Gelora, Sudra dan Chili 109 yang ditanam pada media induksi kalus embriogenik dengan tiga kandungan BAP yang berbeda.

Media induksi kalus	Kultivar cabai	Jumlah eksplan	Eksplan berkalus		Rata-rata kalus embriogenik/kalus
			Jumlah	Persentase	
MKE-1	Gelora	50	20,02±3,31 b	60,0	3,80±1,30 a
	Sudra	50	49,88±3,66 a	99,8	2,20±0,83 b
	Chili 109	60	49,84±3,64 c	83,1	2,17±1,17 b
Rata-rata			39,91	81,0	2,72
MKE-2	Gelora	120	109,69±3,27 b	91,0	5,00±1,28 a
	Sudra	160	159,69±1,85 a	99,9	2,49±1,09 b
	Chili 109	130	129,08±1,78 a	99,0	2,29±1,27 b
Rata-rata			132,82	96,6	3,26
MKE-3	Gelora	140	139,28±3,18 a	99,5	3,29±1,07 a
	Sudra	100	89,59±2,05 a	89,6	2,90±0,74 a
	Chili 109	80	69,96±1,34 c	87,5	3,17±1,17 a
Rata-rata			99,61	92,2	3,12

MKE-1 = MS + 2,4-D 1 mg/l + TDZ 0,1 mg/l, MKE-2 = MS + 2,4-D 3 mg/l + TDZ 0,1 mg/l, MKE-3 = MS + 2,4-D 5 mg/l + TDZ 0,1 mg/l. MS = media Murashige dan Skoog + 3% agar + 0,6% sukrose, TDZ = thidiazuron.

Angka-angka pada satu lajur yang diikuti oleh huruf sama tidak berbeda pada taraf 5% menurut uji jarak berganda Duncan.

adalah kalus cv Gelora (3,8), diikuti oleh Sudra (2,2) dan Chili 109 (2,17) (Tabel 4).

Pada MK-2, persentase pembentukan kalus pada cv Gelora, Sudra, dan Chili berkisar antara 91,1-99,9%, dengan rata-rata 96,6% dan persentase tertinggi pada cv Sudra. Berdasarkan rata-rata jumlah kalus embriogenik per kalus yang terbentuk, maka yang tertinggi adalah kalus cv Gelora (5,0), diikuti oleh Sudra (2,49) dan Chili 109 (2,29).

Pada MK-3, persentase pembentukan kalus pada cv Gelora, Sudra, dan Chili berkisar antara 87,5-99,5%, dengan rata-rata 92,2% dan persentase tertinggi pada cv Gelora. Urutan jumlah kalus embriogenik per kalus yang terbentuk dari kalus asal kultivar pada MKE-3 adalah pada Gelora, diikuti pada Chili 109 dan Sudra, tetapi tidak nyata.

Berdasarkan persentase kalus yang terbentuk pada MKE dan jumlah kalus embriogenik per kalus yang diperoleh, maka media MKE yang mengandung 2,4-D 1-5 mg/l + TDZ 0,1 mg/l dapat digunakan untuk produksi kalus embriogenik dari eksplan cabai cv Gelora, diikuti Sudra, dan Chili 109. Media MKE-2 yang mengandung 2,4-D 3 mg/l + TDZ 0,1 mg/l adalah yang terbaik untuk induksi pembentukan kalus embriogenik cabai cv Gelora, diikuti Sudra, dan Chili 109.

### Pembentukan Tunas dari Kalus Embriogenik

Kalus embriogenik dari ketiga cv cabai yang ditumbuhkan pada tiga komposisi media regenerasi menunjukkan respon yang beragam (Tabel 5). Kalus dari cv Gelora mampu menghasilkan tunas pada ketiga

komposisi media induksi pembentukan tunas (MR-1, MR-2, dan MR-3) dengan rata-rata jumlah tunas yang diperoleh berturut-turut adalah 2,91; 4,7; dan 2,82 (Tabel 5). Kalus cv Chili 109 hanya responsif membentuk tunas pada MR-1, tetapi tidak membentuk tunas pada media MR-2 dan MR-3 yang mengandung BAP 3 dan 5 mg/l. Kalus cv Sudra tidak membentuk tunas pada ketiga komposisi media yang digunakan.

Waktu rata-rata yang diperlukan untuk inisiasi tunas genotipe Gelora dan Chili 109 berkisar antara 7-8 minggu setelah inkubasi, tidak terdapat perbedaan yang nyata antar komposisi media. Rata-rata jumlah tunas yang terbentuk pada kultur umur 4 bulan berkisar antara 2,82-4,73. Rata-rata tinggi tunas pada kultur umur 4 bulan berkisar antara 0,83-1,05 cm sedangkan rata-rata jumlah daun pada tunas yang terbentuk dari kalus berkisar antara 2,0-3,27 daun. MR-2 merupakan media regenerasi tunas terbaik untuk cv Gelora. Rata-rata tinggi tunas cv Gelora MR-1, MR-2, dan MR-3, berkisar antara 0,83-1,38 cm dengan yang tertinggi pada media MR-2 dan terendah pada MR-1 (Tabel 5).

Berdasarkan keseluruhan parameter yang diamati, maka MR-2 (MS + BA 3 mg/l + TDZ 0,5 mg/l) merupakan media dengan komposisi yang paling sesuai untuk regenerasi tunas dari kalus cabai, khususnya untuk cv Gelora. Meskipun demikian, tidak semua kalus-kalus yang terbentuk mampu beregenerasi membentuk tunas, diduga karena karena respon masing-masing kultivar secara genetik tidak sama.

Regenerasi tunas dari kalus ditandai dengan munculnya bercak (*spot*) berwarna yang merupakan

**Tabel 5.** Waktu inisiasi tunas, jumlah tunas, tinggi tunas, dan jumlah daun yang terbentuk pada kalus yang berasal dari eksplan daun muda cabai cv Gelora, Sudra, dan Chili 109 yang ditanam pada tiga media regenerasi dengan kandungan zat pengatur tumbuh BAP berbeda.

Media regenerasi	Kultivar cabai	Rata-rata jumlah tunas	Rata-rata waktu inisiasi tunas (minggu)	Rata-rata tinggi tunas (cm)	Rata-rata jumlah daun
MR-1	Gelora	2,91±1,04 b	8,08±2,83 a	0,83±0,28 b	2,0±0,77 bc
	Sudra	0	0	0	0
	Chili109	1,36±0,67 c	7,91±0,83 a	0,50±0,08 bc	0
Rata-rata		1,09	5,3	0,44	0,63
MR-2	Gelora	4,73±1,62 a	7,00±2,45a b	1,38±0,46 a	3,73±1,42 a
	Sudra	0	0	0	0
	Chili109	0	0	0	0
Rata-rata		1,57	2,3	0,46	1,24
MR-3	Gelora	2,82±0,98 b	7,91±2,74 a	1,05±0,38 a	3,27±1,19 b
	Sudra	0	0	0	0
	Chili109	0	0	0	0
Rata-rata		0,94		0,35	1,09

MR-1 = MS + BAP 1 mg/ml + TDZ 0,5 ml, MS-2 = MS + BAP 3 mg/ml + TDZ 0,5 mg/ml, MS-3 = MS + BAP 5 mg/ml + TDZ 0,5 mg/ml. MS = Murasige dan Skoog (1962), BAP = benzyl amino purine, TDZ = thidiazuron. Jumlah tunas, tinggi tunas, dan jumlah daun per tunas diamati 4 bulan setelah inkubasi.

Angka-angka pada satu lajur yang diikuti oleh huruf sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% menurut uji jarak berganda Duncan.

bakal tunas (Gambar 1). Tunas-tunas muda atau primordia tunas terutama dibentuk oleh eksplan daun muda dari cv Gelora. Primordia tunas yang muncul ditandai dengan tumbuhnya jaringan seperti daun yang berukuran kecil dan lama-kelamaan berkembang menjadi tunas kecil. Selanjutnya tunas-tunas kecil ini dipindahkan ke media inisiasi tunas untuk menginduksi pertumbuhannya menjadi tunas yang lebih besar. Setelah dua bulan pada media regenerasi, primordia tunas sudah terlihat membesar dan berkembang menjadi tunas yang lengkap dengan bagian daun. Ada dua jenis tunas yang tumbuh pada media regenerasi, yaitu (1) tunas yang mempunyai batang dan daun, (2) tunas yang tidak mempunyai batang dan daun (roset). Hasil penelitian Giridhar *et al.* (2004) juga menunjukkan bahwa thidiazuron dapat menginduksi pembentukan embrio somatik pada kultur tanaman kopi (*Coffea arabica* dan *C. canephora*).

#### Induksi Pembentukan Akar dari Tunas Adventif

Pada penelitian ini hanya diuji tunas yang berasal dari kalus cv Gelora dan Chili 109, karena pada percobaan sebelumnya, tunas adventif hanya diperoleh dari kedua cv tersebut. Inisiasi pembentukan akar di-

lakukan dengan menggunakan tunas-tunas yang tumbuh normal dari tunas adventif, yaitu tunas yang mempunyai batang dan daun, dengan ukuran tinggi sekitar  $1,38 \pm 1,05$  cm. Tunas yang berbentuk roset tidak digunakan, karena pertumbuhan pemanjangan tunasnya sangat lambat, sehingga ukurannya masih tetap pendek.

Respon pembentukan akar pada tunas yang berasal dari eksplan daun muda cabai cv Gelora dan Chili 109 terhadap dua media induksi pembentukan akar disajikan pada Tabel 6. Tunas cabai cv Gelora responsif membentuk akar pada media pengakaran dengan persentase 40 dan 33,3% serta rata-rata jumlah akar masing-masing 5,00 dan 3,66 akar per tunas, masing-masing pada media MA-1 dan MA-2 yang menggunakan media dasar MS  $\frac{1}{2}$  dan MS 1, sedangkan tunas dari cv Chili 109 tidak membentuk tunas atau tidak responsif. Jumlah rata-rata tunas yang berakar pada MA-1 dan MA-2 tidak terlalu berbeda, tetapi rata-rata jumlah akar/tunas yang terbentuk berbeda nyata.

Keseluruhan tahapan perkembangan kultur cabai varietas Gelora mulai dari kalus embriogenik yang berasal dari eksplan daun muda hingga pembentukan tunas dan akar disajikan pada Gambar 2.



**Gambar 1.** Pertumbuhan kalus dari eksplan daun muda cabai cv Gelora pada media MS + 2,4-D 1 mg/l + TDZ 0,1 mg/l (A), MS+2,4-D 3 mg/l + TDZ 0,1 mg/l (B), dan MS + 2,4-D 5 mg/l + TDZ 0,1 mg/l (C).

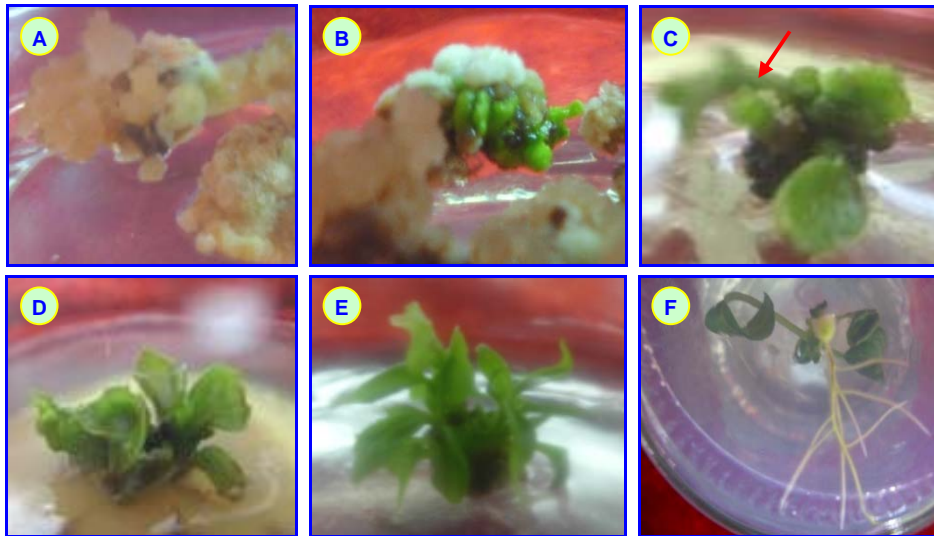
**Tabel 6.** Respon pembentukan akar pada tunas yang berasal dari eksplan daun muda cabai cv Gelora dan Chili 109 terhadap dua komposisi media tumbuh.

Media tumbuh	Kultivar cabai	Jumlah tunas yang diuji	Tunas yang berakar		Rata-rata jumlah akar/tunas
			Jumlah	Persentase	
MA-1	Gelora	40	16	40,0	5,00 $\pm$ 1,53 a
	Chili109	10	0	0	
Rata-rata			8	20	2,5
MA-2	Gelora	30	10	33,3	3,66 $\pm$ 1,24 b
	Chili109	10	0	0	
Rata-rata			5	16,7	1,83

MA-1 = media MS  $\frac{1}{2}$  (Murashige dan Skoog + 0,3% agar) + NAA 0,5 mg/ml, MA-2 = media MS 1 + NAA 0,5 mg/ml. NAA =  $\alpha$ -naphthalene acetic acid.

Angka-angka pada satu lajur yang diikuti oleh huruf sama tidak berbeda pada taraf nyata 5% menurut uji jarak berganda Duncan.





**Gambar 2.** Perkembangan kultur cabai cv Gelora mulai dari eksplan hingga pembentukan tunas. A = kalus embriogenik, B dan C = pembentukan embrio somatik struktur globular pada umur 6 minggu, D = pembentukan tunas umur 9 minggu, E = pertumbuhan dan pembentukan tunas setelah umur 4 bulan, dan F = perkembangan akar pada media pertumbuhan akar.

### KESIMPULAN

Daun muda merupakan sumber eksplan yang terbaik untuk pembentukan kalus dan tunas cabai melalui kultur jaringan dibandingkan dengan hipokotil dan ujung. Gelora merupakan kultivar cabai yang paling responsif baik terhadap pembentukan kalus, tunas, maupun akar pada masing-masing media yang digunakan dibandingkan dengan cv Sudra dan Chili 109. Media MS yang mengandung BAP 3-7 mg/ml dan NAA 1 mg/ml dapat digunakan untuk menginduksi pertumbuhan kalus dari eksplan daun muda, hipokotil, dan ujung akar kecambah cabai cv Gelora, Sudra, dan Chili 109, tetapi pertumbuhannya sangat lambat dan tidak menghasilkan kalus embriogenik. Pembentukan kalus embriogenik dapat diinduksi dengan baik menumbuhkan kalus non embriogenik pada media MS yang mengandung sitokinin 2,4-D 3 mg/l dan TDZ 0,5 mg/l. Pembentukan kalus menjadi tunas (kalus yang dapat beregenerasi) sebaiknya menggunakan media MS + 2,4-D 3 mg/l + TDZ yang dilanjutkan dengan perlakuan subkultur pada media MS + BAP 3 mg/l + TDZ 0,5 mg/l untuk menginduksi pemanjangan tunas. Media MS  $\frac{1}{2}$ -1 + NAA 0,5-1,0 mg/l dapat digunakan untuk menginduksi pembentukan akar pada kultur tunas cabai cv Gelora, tetapi tidak dapat digunakan untuk Chili 109.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya disampaikan kepada Badan Litbang Pertanian dan Pimpinan Proyek Kerja Sama Kemitraan

Penelitian Pertanian dengan Perguruan Tinggi (KKP3T) atas dukungan dana penelitian.

### DAFTAR PUSTAKA

- Arous, S., M. Boussaid, and M. Marrachi. 2001. Plant regeneration from zygotic embryo hypocotyls of Tunisian chili (*Capsicum annum* L.). *J. Appl. Hort.* 3(1):17-22.
- Badan Pusat Statistik. 2009. Produksi sayuran Indonesia. Jakarta. [http://www.bps.go.id/tab\\_sub/view.php?tabel=1&daftar=1&id\\_subjek=55&notab=15](http://www.bps.go.id/tab_sub/view.php?tabel=1&daftar=1&id_subjek=55&notab=15) [17 Mei 2010].
- Berke, T.G. 2002. Hybrid Seed Production in *Capsicum*. In A.S. Basra (ed.) *Hybrid Seed Production in Vegetables: Rationale and methods in selected Crops*. Food Products, New York.
- Direktorat Bina Program Tanaman Pangan dan Hortikultura. 2004. Luas panen, rata-rata hasil dan produksi tanaman hortikultura di Indonesia. Departemen Pertanian: <http://www.dbph.go.id>. [20 Maret 2009].
- Direktorat Jenderal Bina Produksi Hortikultura. 2004. Luas panen, rata-rata hasil dan produksi tanaman hortikultura di Indonesia. Departemen Pertanian: <http://www.dbph.go.id>. [20 Maret 2009].
- Direktorat Jenderal Bina Produksi Hortikultura. 2007. Perkembangan luas panen sayuran tahun 1996-2005. [terhubung berkala]. <http://www.deptan.go.id>. [14 Desember 2007].
- Duriat, A.S. 1996. Cabai merah: Komoditas Prospektif dan Andalan. hlm. 1-3. Dalam A.S. Duriat, W.H. Widjaja, T.A. Soetiarso, dan L. Prabaningrum (eds.) *Teknologi Produksi Cabai Merah*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Hortikultura. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Jakarta.

- Ebida, A.I. and C.Y. Hu. 1993. In vitro morphogenetic responses and plant regeneration from pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Early California Wonder) seedling explants. *Plant Cell Rep.* 13:107-110.
- Giridhar, P., K. Vinod, E.P. Indu, G.A. Ravishankar, and A. Chandrasekar. 2004. Thidiazuron induced somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. dan *C. canephora* P. ex Fr. *Acta Bot. Croat.* 63:25-33.
- Gubis, J., Laichova, J. Farago, and S. Jurekova. 2003. Effect of genotype and explant type on shoot regeneration in tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Biol. Bratisl.* 59(3):405-408.
- Hutami, S., I. Mariska, dan Y. Supriyati. 2006. Peningkatan keragaman genetik tanaman melalui keragaman soomaklonal. *J. AgroBiogen* 2(2):81-88.
- Kintzios, S., J.B. Drossopoulos, E. Shortsiannis, and D. Peppes. 2000. Induction of somatic embryogenesis from young, fully expanded leaves of chilli pepper (*C. annuum* L.): Effect of leaf position, illumination and explants pretreatment with high cytokinin concentration. *Scientia Horticulturae* 85:137-144.
- Moghaieb, R.E.A., H. Saneoka, and K. Fujita. 1999. Plant regeneration from hypocotyls and cotyledon explants of tomato (*L. esculentum* Mill.). *Soil Sci. Plant Nutr.* 45:639-646.
- Parimalan R., P. Giridhar, H.B. Gururaj, and G.A. Ravishankar. 2007. Organogenesis from cotyledon and hypocotyls-derived explants of japhara (*Bixa orellana* L.). *Acta Bot. Croat.* 66(2)153-160.
- Suwandi, N., Nurtika, dan S. Sahat. 1989. Bercocok Tanaman Sayuran Dataran Rendah. Balai Penelitian Hortikultura Lembang dan Proyek ATA 395, Lembang, Bandung. hlm. 3.1-3.6.
- Wiriyanta, B.T.W. 2002. Bertanam Cabai Pada Musim Hujan. Agromedia Pustaka, Jakarta.
-